

多重耐药志贺菌整合子的序列分析

朱静媛 段广才 范清堂 郝园林

【关键词】 志贺菌; 耐药性; 整合子

Sequence analysis of integrons in multi-drug resistant *Shigella* isolates ZHU Jing-yuan¹, DUAN Guang-cai^{2,3}, FAN Qing-tang³, XI Yuan-lin². 1 Department of Environmental Health, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2 Department of Epidemiology, College of Public Health, Zhengzhou University; 3 Henan Key Laboratory of Molecular Medicine

Corresponding author: DUAN Guang-cai, Email: gcduan@zzu.edu.cn

This work was supported by a grant from the Ministry of Health of China (No. WKJ2007-2-024).

【Key words】 *Shigella*; Resistance; Integron

志贺菌属(*Shigella*)频繁出现耐药菌株,严重影响临床治疗的疗效。近年研究发现整合子-耐药基因盒与志贺菌属的耐药性有关^[1],为探索志贺菌属多重耐药株携带整合子的序列结构特点,本研究对多重耐药志贺菌株的 1 类和 2 类整合子-耐药基因盒进行 PCR 扩增和序列分析。

1. 材料与方法:

(1) 菌株与主要试剂: 菌株为多重耐药志贺菌 06208 和 H24(对磺胺甲基异恶唑、四环素、吡哌酸和氨苄青霉素耐药)。细菌基因组 DNA 提取试剂盒为美国 Axygen 公司产品,具有高保真功能的 Taq plus DNA 聚合酶购自天根生化科技(北京)有限公司。

(2) PCR 扩增: 1 类整合子和耐药基因盒上游引物为 *int1*1F(5'-GGA CGC AGG GAG GAC TTT-3'),下游引物为 *hep59*(5'-AAG CAG ACT TGA CCT GAT-3'); 2 类整合子引物上游引物为 *int2*2F(5'-CGC AAG CTT AGG GGC TAC TCA GGG CTA-3'),下游引物为 *hep74*(5'-CCG AAT TCG ATG CCA TCG CAA GTA CGA G-3')。退火温度从 68 ℃ 开始每个循环降低 1 ~ 56 ℃,共进行 30 个循环。引物合成及 PCR 产物测序由北京博尚生物公司完成。

(3) 序列分析: 采用 GenBank 数据库的 Blastn 软件,在 GenBank、EMBL、DDBJ 和 PDB 数据库中对目的基因进行序列检索和同源性比较。用 Clustal X 软件进行多重序列比较,

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.02.021

基金项目: 卫生部科研基金(WKJ2007-2-024)

作者单位: 450001 郑州大学公共卫生学院环境卫生学教研室(朱静媛), 流行病学教研室(段广才、郝园林); 河南省分子医学重点实验室(段广才、范清堂)

通信作者: 段广才, Email: gcduan@zzu.edu.cn

用 MEGA 4.1 软件构建系统进化树,构建方法选择基于距离的邻接法(neighbor joining, NJ),用 Bootstrap 法进行进化树的验证分析。

2. 结果:

(1) 1 类整合子序列的测序和聚类分析: 对多重耐药志贺菌的基因组 DNA 进行 1 类整合子全序列 PCR 扩增后,测序获得 2813 bp 片段,包括整合酶基因 *int1*(97 ~ 1110 bp)和耐药基因盒 *dfrA1-aadA5*(1268 ~ 2660 bp)。序列提交至 GenBank 数据库获得的序列号为 FJ895301。对 FJ895301 序列中的整合酶基因 *int1* 进行 Blast 检索分析,发现 3' 末端的耐药基因盒启动子为 P1 (TGG ACA -17 bp-TAA GCT) 和 P2 (TTG TTA-14 bp-TAC AGT)。聚类分析发现进化树上的自引导值均 < 70,提示 1 类整合子的整合酶基因尚未发生分化。对 FJ895301 序列中的耐药基因盒 *dfrA17-aadA5* 序列进行比对分析,在包括大肠埃希菌科在内的多个菌属中均发现相似序列,3 个来自克雷伯菌和大肠埃希菌的 *dfrA17-aadA5* 序列自成一类,而本研究获得的耐药志贺菌属的 *dfrA17-aadA5* 序列与绝大多数其他相似序列属于另一类(图 1)。

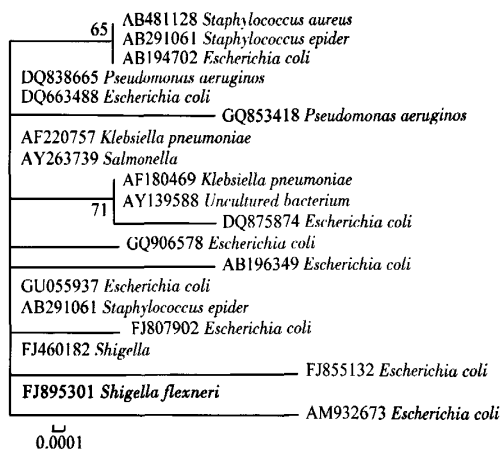


图 1 1 类整合子耐药基因盒 *dfrA17-aadA5*(FJ895301) 的系统进化树分析

(2) 2 类整合子序列的测序和聚类分析: 对多重耐药志贺菌的基因组 DNA 进行 2 类整合子全序列 PCR 扩增后,测序获得 3395 bp 片段,包括整合酶基因 *int2*(40 ~ 1017 bp)和耐药基因盒 *dfrA1-sat1-aadA1*(1349 ~ 3287 bp)。序列提交至 GenBank 数据库获得的序列号为 EF634237。对 2 类整合子的整合酶基因 *int2* 进行序列比对,发现编码第 179 个氨基酸编码位置为终止密码子 TAA。聚类分析发现来自多重耐药志贺菌的 *int2* 基因序列与绝大多数相似序列为一类(图

2)。另一类来自大肠埃希菌和普罗威登斯菌的 *intI2* 序列第 179 位氨基酸编码位置并非终止密码子 TAA 而是 CAA, 编码谷氨酸。来自多重耐药志贺菌的 *dfrA1-sat1-aadA1* 基因序列与大多数序列为一类, 来自其他志贺菌属的 2 个序列和来自沙门菌属、霍乱弧菌的序列组成了另外一类 (图 3)。

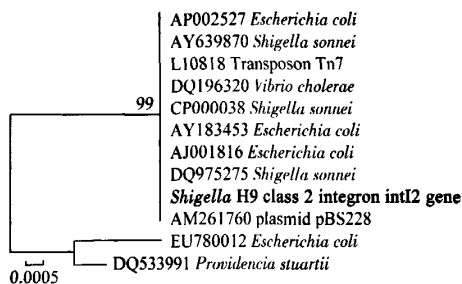


图 2 *intI2* 基因的系统进化树分析

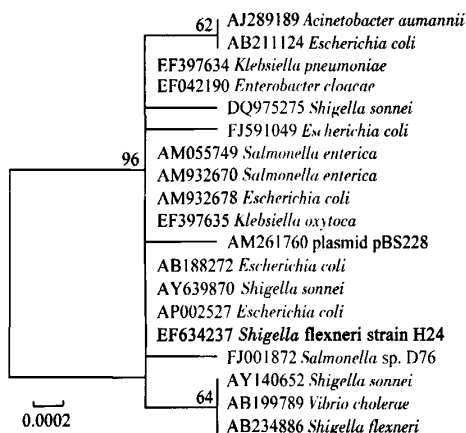


图 3 2 类整合子耐药基因盒 *dfrA1-sat1-aadA1* 的系统进化树分析

3. 讨论: 已有研究表明志贺菌属中 1 类整合子较为少见^[2], 而本研究得到的 1 类整合子耐药基因盒的启动子序列 P1 和 P2 均为弱变异性^[3], 提示这个启动子功能不强, 将影响后续耐药基因盒的表达。本研究得到的 2 类整合子整合酶基因含有终止密码子, 其功能值得怀疑。但有研究表明, 当 2 类整合子与 1 类整合子共存时, 2 类整合子可以借用 1 类整合子的整合酶基因完成整合或切除^[4]。因此, 有必要对志贺菌属 2 类整合子与 1 类整合子共存时的作用进行深入的研究。另外, 2 类整合子的整合酶基因突变、恢复活性的现象提示应注意这些突变可能带来的细菌耐药性的变化。聚类分析发现, 来自多重耐药志贺菌的 1 类整合子耐药基因盒 *dfrA17-aadA5*, 2 类整合子的整合酶基因 *intI2* 和 2 类整合子耐药基因盒 *dfrA1-sat1-aadA1* 在其基因家族中均发生了分化, 来自多重耐药志贺菌的上述基因, 与已报道的来自其他细菌的大多数相应序列为一类, 提示多重耐药志贺菌中的整合子-耐药基因盒系统与其他诸多菌属、菌株关系密切。

参 考 文 献

- [1] Peirano G, Agerso Y, Aarestrup FM, et al. Occurrence of integrons and resistance genes among sulphonamide-resistant *Shigella* spp. from Brazil. J Antimicrob Chemother, 2005, 55(3): 301-305.
- [2] Pan JC, Ye R, Meng DM, et al. Molecular characteristics of class 1 and class 2 integrons and their relationships to antibiotic resistance in clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. J Antimicrob Chemother, 2006, 58(2): 288-296.
- [3] Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, et al. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(1): 79-114.
- [4] Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons. Clin Microbiol Infect, 2004, 10(4): 272-288.

(收稿日期: 2010-05-31)

(本文编辑: 万玉立)

HIV-1 辅助受体及配体基因多态性在新疆高危人群中的分布

谭晓华 郭淑霞 张景玉 狄春红 杨磊 曹亦菲 何平 王菊萍 魏兴武

【关键词】维吾尔族; 艾滋病

Distribution of gene variants regarding co-receptor and their ligands among HIV-1 infected and uninfected high-risk groups in Xinjiang Uighurs Autonomous Region,

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.02.022

基金项目: 国家自然科学基金(30700687); 新疆生产建设兵团医药卫生专项课题(05GG36)

作者单位: 310036 杭州师范大学医药卫生管理学院(谭晓华、狄春红、杨磊、曹亦菲、何平); 石河子大学医学院(郭淑霞、张景玉); 新疆维吾尔自治区伊宁市疾病预防控制中心(王菊萍); 石河子市卫生监督所(魏兴武)

通信作者: 杨磊, Email: yanglei62@yahoo.com

China TAN Xiao-hua¹, GUO Shu-xia², ZHANG Jing-yu², DI Chun-hong¹, YANG Lei¹, CAO Yi-fei¹, HE Ping¹, WANG Ju-ping³, WEI Xing-wu⁴. 1 School of Medical and Health Administration, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China; 2 Shihezi University School of Medicine; 3 Yining Center for Diseases Control and Prevention, Xinjiang Uygur Autonomous Region; 4 Institute of Health Inspection of Shihezi

Corresponding author: YANG Lei, Email: yanglei62@yahoo.com This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 30700687) and Special Issue of the Medical and Health of Xinjiang Production and Construction Corps (No. 05GG36).

【Key words】Uighurs; Human immunodeficiency virus